

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-322881

(43)公開日 平成7年(1995)12月12日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	Z NA			
C 12 Q 1/68	A 9453-4B			
G 01 N 33/50	T			
	9281-4B		C 12 N 15/ 00	Z NA A

審査請求 未請求 請求項の数20 FD (全 27 頁)

(21)出願番号	特願平6-142564	(71)出願人	390037006 株式会社エスアールエル 東京都立川市曙町二丁目41番19号
(22)出願日	平成6年(1994)5月31日	(72)発明者	向出 雅一 東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア ールエル八王子ラボラトリ一内
		(72)発明者	引地 一昌 東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア ールエル八王子ラボラトリ一内
		(74)代理人	弁理士 谷川 英次郎

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド、それから成るC型肝炎診断試薬及びそれを用いたC型肝炎の診断方法

(57)【要約】

【目的】 検体中のHCV間にゲノムの塩基配列に関して変異があるか否かを簡便にかつ高感度に知ることができるC型肝炎の診断手段を提供すること。

【構成】 配列番号1~10の新規なオリゴヌクレオチドを提供した。また、配列番号1、3、5、7、8及び9記載のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドと、配列番号2、4及び6記載のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcDNAを増幅し、増幅産物を変性状態で電気泳動にかけ、バンドの位置を検出することを含むC型肝炎の診断方法を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 5' CACCGCATGGCGTGGGATAT 3' (ただし、WはA又はT) で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項2】 5' GGGCTNGGRGTGAAGCARTA 3' (ただし、NはA又はC又はG又はT、RはA又はG) で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項3】 5' TTGGGATATGATGATGAAGCTGG 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 5' CTGTTGATGTGCCAGCTGCC 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項5】 5' GGATATGATGATGAAGTGG 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項6】 5' TCYGTCTCATTYGCCCTCA 3' (ただし、YはT又はC) で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 5' GGNCAYHGNATGGCCTGG 3' (ただし、NはA又はC又はG又はT、YはT又はC) で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 5' GCTACTCTTGCCGGCGT 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項9】 5' CTCTTGCCGGCGTTGACG 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 5' GAGGAACCTACTGTCTTCACG 3' で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 請求項1ないし10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドから成るC型肝炎診断薬。

【請求項12】 請求項1、3、5、7、8及び9記載のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドと、請求項2、4及び6記載のオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcDNAを増幅し、増幅産物を変性状態で電気泳動にかけ、バンドの位置を検出することを含むC型肝炎の診断方法。

【請求項13】 前記PCRを2段階に分けて行い、1回目のPCRに用いるプライマーと2回目のPCRに用いるプライマーが異なっている請求項12記載の方法。

【請求項14】 1回目のPCRに請求項1、請求項2及び請求項4記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項13記載の方法。

【請求項15】 2回目のPCRに請求項3及び請求項4記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項13又は14記載の方法。

【請求項16】 2回目のPCRに請求項5及び請求項4記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項13又は14記載の方法。

【請求項17】 2回目のPCRに請求項8及び請求項4記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項13又は14記載の方法。

【請求項18】 2回目のPCRに請求項9及び請求項4記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項13又は14記載の方法。

【請求項19】 前記電気泳動は1°C~42°Cの温度下で行う請求項12ないし18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 請求項1ないし10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcDNAを増幅することを含むC型肝炎ウイルスの増幅方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なオリゴヌクレオチド、それから成るC型肝炎診断薬及びそれを用いたC型肝炎診断方法及びC型肝炎ウイルスの増幅方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】C型肝炎に対しては、インターフェロン(以下、「IFN」ということがある)が有効であることが知られている。しかしながら、IFNによるC型肝炎の治療効果は、人体中のC型肝炎ウイルス(以下、「HCV」ということがある)のクローン数が多くなると低下することも知られている。すなわち、人体中のHCVが単一クローン起源である場合にはIFNによる治療効果が高いが、複数クローン起源の場合には治療効果が低く、例えば、HCVが人体内で変異を起こして複数クローンとなる場合には治療効果が低い。従って、検体中のHCVに変異が存在するか否かを調べることは、その患者にIFNによる治療が有効であるか否かを知る上で重要である。

【0003】従来より、HCVゲノムのcDNAをPCR(ポリメラーゼ・チエイン・リアクション法)により増幅し、電気泳動にかけることによりC型肝炎の診断を行うことが知られている。例えば、特開平5-301887号公報には、特定のオリゴヌクレオチドを用いてHCVゲノムのcDNAをPCRにより増幅後、電気泳動にかけてバンドを検出することによりHCVを4種類のジェノタイプに分類する方法が記載されている。しかしながら、この方法では、HCVを4種類のジェノタイプに重複することなく分類することは可能であるが、検体中に含まれるHCVが単一クローン起源か否か、すなわち、各HCV間に変異があるか否かを知ることはほとんどできない。すなわち、当該変異により、決定されるジェノタイプが異なってくる場合には変異があるか否かを知ることができるが、同一のジェノタイプに包含されるHCV間に変異があるか否かは知ることができない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、検体中のHCV間にゲノムの塩基配列に関して変異があるか否かを簡便にかつ高感度に知ることができるC

型肝炎の診断手段を提供することである。また、本発明は、高感度にHCVを増幅できる方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】HCVゲノムには、超可変領域（以下、「HVR」と言うことがある）と呼ばれる、高い頻度で変異を起こす領域が知られている（中沢貴秀ら、日本臨牀 51巻2号（2, 1993）、66-70頁）。本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることにより、現在知られている全てのHCVクローンについて、このHVRを含む領域をPCRで増幅することができ、かつ、PCRの増幅産物を変性状態で、電気泳動にかけることにより各HCVのHVRに変異が存在するか否かを容易に知ることができることを見出し、本発明を完成了。

【0006】すなわち、本発明は、下記の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

5' CACCGCATGGCWTGGATAT 3' (ただし、WはA又はT)  
(以下、このオリゴヌクレオチドを「MS1」と言う)  
5' GGGCTNGRGTGAAGCARTA 3' (ただし、NはA又はC又はG又はT、RはA又はG) (以下、このオリゴヌクレオチドを「MR1」と言う)  
5' TTGGGATATGATGATGAACTGG 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS2」と言う)  
5' CTGTTGATGTGCCAGCTGCC 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MR2」と言う)  
5' GGATATGATGATGAACTGG 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS3」と言う)  
5' TCYGTCTCATTYGCCCTCA 3' (ただし、YはT又はC)  
(以下、このオリゴヌクレオチドを「MR1」と言う)  
5' GGNCAHYGNATGGCNTGG 3' (ただし、NはA又はC又はG又はT、YはT又はC) (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS4」と言う)  
5' GCTACTCTTGTGCCGGCT 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS5」と言う)

5' CTCTTGTCCGGCTTGACG 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS6」と言う)  
5' GAGGAACACTGTCTTCACG 3' (以下、このオリゴヌクレオチドを「MS13」と言う)

【0007】また、本発明は、上記オリゴヌクレオチドから成るC型肝炎診断薬を提供する。さらにまた、本発明は、オリゴヌクレオチドの少なくとも2種類をプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcDNAを増幅し、増幅産物を変性状態で電気泳動にかけ、バンドの位置を検出することを含むC型肝炎の診断方法を提供する。さらにまた、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つをプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcD

NAを増幅することを含むC型肝炎ウイルスの増幅方法を提供する。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】本願発明者らは、HCVゲノムのHVR領域を含む領域をPCRにより増幅し、増幅産物を変性後、電気泳動にかけ、現れるバンドを検出することにより、検体中に何クローニングのHCVが含まれているかを知ることができることに想到した。DNAを変性状態（一本鎖状態）で電気泳動にかけることにより、DNA中の

10 点突然変異の有無を検出できることは公知である (Orlitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766, 1989)。この方法はSSCP法 (single strand conformation polymorphism)と呼ばれている。一本鎖DNAは、その塩基配列に特有の立体構造をとる。従って、DNAの塩基配列が1塩基でも異なっておれば、それによって立体構造が異なるため、電気泳動における移動度が異なる。従って、一本鎖状態でDNAを電気泳動にかけ、バンドが何本現れるかによって試料DNAが何種類のDNAを含んでいるかを知ることができる。

20 【0010】この方法を適用して、HCVの変異を調べるためにには、先ず、数十種類にも及ぶHCVの全てのHVR領域を増幅できるプライマーを開発しなければならない。さらに、SSCP法は、試料DNAのサイズが大きくなると感度が低下するので、増幅される領域のサイズは約400kb以下でなければならない。このような制約の下でプライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチドを見つけ出さなければならない。

【0011】本願発明者らは、後述の参考例1に詳述するように、データベースに登録されたHCVゲノムのH

30 VRを包含する領域（E1-E2/NS1領域）の塩基配列及び慢性C型肝炎患者の血清からクローニングしたHCVのE1-E2/NS1領域の塩基配列を丹念に比較し、上記の条件を満足し得るプライマーを提供することに成功した。このようにして開発されたプライマーが上述のMS1、MR1、MS2、MR2、MS3、MR1'、MS4、MS5及びMS6である。

【0012】また、HCVの5'非翻訳領域を増幅するためのプライマーとして、従来のプライマーよりも検出感度が高い上記MS1-3を見出した。5'非翻訳領域における変異もHCVの変異を調べるために有効な領域であることが知られており、5'非翻訳領域の変異と上記HVR領域の変異を調べることにより、HCVの変異をより高感度に検出することができる。

【0013】これらのオリゴヌクレオチドの位置を図1及び図2に示す。なお、図1及び図2に示される塩基配列は、日本人のC型肝炎患者から得られたHCVのゲノムの塩基配列の一部を一例として示したものである (Kato, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 9524-9528 (1990)、GeneBank)。これらのオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成機を用いて容易に化学合成

することができる。

【0014】なお、上記プライマーのうち、MS1、MR1、MR1'及びMS4は一般式で示されているが、C型肝炎の診断にあたっては、一般式に包含される全てのオリゴヌクレオチドを混合して用いる。

【0015】なお、上記した本発明のオリゴヌクレオチドは、PCRのためのプライマーとしてのみならず、cDNA合成のためのプライマーとしても用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて合成したcDNAも本発明の方法に供することができる。

【0016】次に、上記オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてC型肝炎を診断する方法を説明する。

【0017】診断に供する検体としては、人の体液を用いることができ、例えば血清を好ましく用いることができる。先ず、検体から全RNAを抽出し、それらのcDNAを合成する。これらの操作はこの分野において周知の方法により行うことができ、そのための試薬も市販されている。

【0018】次いで、得られたcDNAライブラリーを鏡型として、PCRによりDNAを増幅する。PCRの操作自体はこの分野において周知であり、そのためのキットも市販されている。PCRに用いるプライマーとして、上記した本発明のオリゴヌクレオチドを用いる。PCRを行うためには、増幅する領域の両端にハイブリダイズする第1及び第2のプライマーを用いる必要がある。HCVのHVRを含む領域を増幅する場合、HVR領域の上流領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを第1のプライマーとして用い、HVR領域の下流領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを第2のプライマーとして用いる。図1及び図2に示すように、上記オリゴヌクレオチドのうち、MS1、MS2、MS3、MS4、MS5及びMS6がHVR領域の上流領域にハイブリダイズするので、これらのうちのいずれかを第1のプライマーとして用いる。また、MR1、MR2及びMR1'がHVR領域の下流領域にハイブリダイズするので、これらのうちのいずれかを第2のプライマーとして用いる。また、5'非翻訳領域を増幅する場合には、上記MS13を第1のプライマーとして用い、第2のプライマーとしては、例えば従来より公知のYCA(5'-ACTCGCAAGCACCTATCA-3')又はYCS1(5'-CGACA CTCCACCATAGATC-3')を用いることができる(下記実施例5参照)。

【0019】PCRは一段階で実施してもよいが、二段階で実施すると検出の感度が高まるので好ましい。すなわち、1回目のPCRでHVR領域を含む領域又は5'非翻訳領域を増幅し、2回目のPCRでその増幅された領域内の領域を増幅し、この2回目のPCRで増幅された領域を電気泳動で検出することにより、より高感度の診断が可能になる。この場合、1回目のPCRで用いる

プライマー及び2回目のPCRで用いるプライマーは、1回目のPCRで増幅される領域が2回目のPCRで増幅される領域よりも広くなるように選択する。また、1回目のPCRで増幅された領域のバンドが後の電気泳動で検出されないように2回目に用いるオリゴヌクレオチドは1回目よりTm値(Tm値=4°C×G、Cの数+2°C×A、Tの数)を高く設定することが好ましい。このような例として、1回目のPCRのプライマーとしてMS1とMR1又はMS1とMR1及びMR2を用い、2回目のPCRのプライマーとしてMS2とMR2、MS3とMR2、MS5とMR2又はMS6とMR2を用いる場合を挙げることができる。下記実施例3に示すように、1回目のPCRにMS1とMR1及びMR2を用い、2回目のPCRにMS2とMR2又はMS3とMR2を用いた場合が最も高感度になるので好ましい。なお、この例から明らかのように、1回目のPCRでは上記のオリゴヌクレオチドのうち、複数のものを用いることも可能である。さらに、2回目のPCRにおけるアニール温度を1回目のPCRにおけるアニール温度よりも高く設定することが好ましい。例えば、下記実施例では、1回目のPCRのアニール温度を45°Cとし、2回目のPCRのアニール温度を55°Cとしている。

【0020】PCRによりDNAを増幅した後、増幅されたDNAを変性状態、すなわち一本鎖の状態で電気泳動にかける。変性は、例えばフォルムアミド溶液にPCR産物を加え、これを80°C~95°C程度の温度に加熱することにより行うことができる。変性状態で電気泳動にかけるために、変性した増幅産物をアニールすることなく急冷する。これは、例えば、変性した増幅産物を含むチューブを氷上で10分間程度放置することにより達成することができる。次いで、この冷却した試料を、1~42°C、好ましくは4~37°C程度、さらに好ましくは約10°C程度に保持されたゲル上で電気泳動にかける。

【0021】上述の、変性状態での電気泳動は、上記のようにSSCP法と呼ばれるものであり、この方法では、2つのDNAのヌクレオチド配列が1塩基でも異なっておれば、DNAがとる立体構造の相違に基づく移動度の差により、この2つのDNAのバンドが異なった位置に現れる。従って、増幅されたDNAが何種類あるかを知ることができる。従って、検体中に含まれるHCVが單一クローンである場合、すなわち、増幅されたDNAが1種類しか存在しない場合には、2本のバンドが現れる(変性により1本の二本鎖DNAが二本の一本鎖DNAに分離するため)。同様に、2クローンの場合には4本、3クローンの場合には6本のバンドが現れる。なお、バンドの検出は、常法により、臭化エチジウム染色や銀染色等により容易に行うことができる。

【0022】なお、増幅産物は、上記のようなSSCP法による解析の他、TGGE法やDGGE法により解析

することも可能である。DGGEとはdenaturing gradient gel electrophoresisの略語 (Fischer, S.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci.: 1579, 315, 1985) でアルカリ変性濃度勾配アクリラミドゲルを用い電気泳動を行うものである。TGGEとはtemperature gradient gel electrophoresisの略語で、温度勾配アクリラミドゲルを用いて電気泳動を行う方法である (文献: D. Riesner et al., Electrophoresis 10: 377-389 (1989) )。

【0023】これらの電気泳動の際、塩基配列に依存したDNAバンドの分離をよくする方法として、先のヘテロ2重鎖法 (heteroduplex analysis: C.M. Nagamine, et al., Am. J. Hum. Genet., 45, 337, 1989) を用いることができる。この方法では、DNAを変性後 (アルカリ変性又は熱変性) アニール (再生) させる。1種類の塩基配列では1本のバンドを形成する。DGGE、TGGEでは2種類 (複数) の塩基配列では元の2本鎖 (複数) 以外に2種類 (複数) のヘテロ2重鎖を形成し、適当なアクリラミドゲル (たとえば、MDE Gel: Mutation detection enhancement gel, AT Biochem. Inc. 30 Spring Mill Drive, Malvern, PA 19355) を用いた場合は元の2本鎖 (複数) 以外に1種類 (複数/2) のヘテロ2重鎖を形成する (J. Keen, et al.,: Genetics, 7, 5, 1991)。また、検出されるバンド数を減らす方法として、アシメトリックPCR法を用いることができる (Gyllensten, U.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7652, 1988)。この方法は、PCRを行う際に使用する2対のオリゴヌクレオチドの一方を他方より量的に少なくし (たとえば50:1)、1本鎖を優先的に増幅する方法で、2本鎖に比べ、SSCP電気泳動後の出現バンド数は半分となり、出現バンドが多い場合、バンドの分離が改善され、また、出現するバンドがDNAの種類となる。

【0024】なお、TGGE法やDGGE法を用いる場合には、2回目のPCRの際に用いるオリゴヌクレオチドの5'末端に 5' OGCCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC 3' のオリゴヌクレオチドをつけることが望ましい。

【0025】本発明はまた、上述のように、上記本発明のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つをプライマーとして用いたPCRにより、検体中のHCVゲノムのcDNAを増幅することを含む、HCVの増幅方法を提供する。HCVゲノムで非常に共通性の高い上記本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることで、5'非翻訳領域と、E1、E2/NS1領域の塩基配列決定を高感度 (検出率) で行うことができる。また、同様な理由で、C型肝炎ウイルスを高感度で検出することができる。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に

説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0027】参考例1 プライマー配列の設定

本発明のオリゴヌクレオチドの配列は、次のようにして決定した。すなわち、データベース (商品名GeneBank、ロスアラモス、USA) に登録された種々のHCVクローンのE1-E2/NS1領域を比較することにより、HVR領域を挟む、保存性の高い領域と相補的なオリゴヌクレオチドである上記MS1及びMR1を設定した。MS1及びMR1は、検出率をできるだけ上げるために混合オリゴヌクレオチドとした。

【0028】C型慢性肝炎患者の血清よりRNAを抽出し、オリゴヌクレオチドMS1、MR1を用いてHVRを含むHCVのE1-E2/NS1領域の一部をPCRにより増幅後、BluescriptII (STRATAGENE, USA) にクローニングし、各クローンに単離した。それらの塩基配列を決定した。さらにHCVのE1-E2/NS1領域の既存の塩基配列をGeneBank (商品名) より入手し、さきに得られた塩基配列と比較した。

【0029】さらに、プライマー設定に際しては、できるだけHCV間で共通で特に3'末端が共通であるように設定した。また、検出率を上げるために混合プライマーを設定した。HCVは変異を起こしやすくプライマーの設定は、検出率に影響を与える為にその選定は検出率に影響を与える。また、これらのプライマーはGC%が10から90%の範囲で、望ましくは40から60%が良い。これらを考慮した上で検討した結果、図2~図14に示すように比較的各HCVクローン間で保存性の高い共通配列を見いだし同領域のDNA増幅に適したプライマーである上記MS2、MR2、MS3、MR1'、MS4、MS5及びMS6を設定した。また、5'非翻訳領域についても同様な検索を行い、上記MS1を設定した。

【0030】実施例1 HCVのHVR領域の変異の検出

IFN $\alpha$ 治療に対しての著効例であった慢性C型肝炎患者より経時的に末梢血を採取しHCV-HVRのSSCP解析を以下のようにして行った。

【0031】(1) RNA抽出、cDNA合成、PCR

患者血清100 $\mu$ lをRNAzol B (商品名、BIO TEX Inc., USA) 900 $\mu$ l及びクロロホルム150 $\mu$ lと混合し、5秒間攪拌し、-20°Cで5分間インキュベートした。次いで12000 rpmで5分間遠心し、上清 (600 $\mu$ l) を500 $\mu$ lのイソプロパノール及び5 $\mu$ l (20ng) のグリコーゲンと混合し、4°Cで15分間反応させた。次いでこれを12000 rpmで20分間遠心した。沈殿に1mlの75%エタノールを加えて懸濁後、12000 rpmで5分間遠心した。この75%エタノール処理-遠心操作をさらに2回行い、沈殿をデシケーター中で15分間乾燥さ

せ、精製された抽出RNAを得た。次いで、抽出したRNAを錠型とし、ランダムヘキサマーのオリゴヌクレオチド(5'-NNNNNN-3'; N=AまたはTまたはGまたはC)をプライマーとして用いて常法によりcDNA合成した(37℃、90分)。その一部をオリゴヌクレオチドMS1, MR1, MR2を用いてPCR法(Saikiら、Science、239、487-491、1988)により増幅(PCRサイクル35、変性94℃、1分、アニール45℃、2分、伸長72℃、3分)し、増幅産物の一部をオリゴヌクレオチドMS2, MR2を用いて2回目のPCR(PCRサイクル25、変性94℃、1分、アニール55℃、2分、伸長72℃、3分)を行いさらに増幅させた。3%アガロース電気泳動で315bpの増幅産物を確認した。

#### 【0032】(2) SSCP解析

その一部を80℃で2分間処理することにより熱変性後、10℃に保ち、5分放置した。これをあらかじめ冷却型恒温水槽(スーパースタッドミニPID、AB-1600型、アトー株式会社)で10℃一定に保った電気泳動槽(レゾマックス・2連ミニスラブ、ゲルサイズ: 90mm(W) × 80mm(H))で厚さ1mmの1/3MDEゲル(AT Biochem)を用いて電気泳動を行った。電気泳動条件: 300V一定、トリス-グリシンバッファー、3時間、10℃。電気泳動後、臭化エチジウムの水溶液で15分染色後、紫外線照射下でポラロイド撮影を行った。その結果、明瞭な2本のバンドが観察された。

【0033】著効例である本症例ではIFN投与前のHCV-HVRのSSCP解析バンド数が2本であり、HCVは単一クローニングであった。IFN治療中もクローニング数は変わらず、バンド移動度は変化しなかった。また、HCV-RNAは、16週から陰性化し、GPTは正常化、IFN治療終了後24週でもHCV-RNAは検出されなかった。この結果は多くの文献の結果と一致(著効例ではクローニング数が単一か少ない)するものである。

#### 【0034】実施例2

IFN $\alpha$ 不応例の慢性C型肝炎患者について、IFN治療中及び治療後のHCV-HVRのSSCP解析を実施\*

\*例1と同様に行った。IFN治療中はSSCP結果のバンドパターンが変動し、バンド数も増加し、IFN治療後も変動し続けた(図15)。なお、図15における各レーンの血清採取時期及びその時点でのGTP活性を表1に示す。HCVはHIV同様エンベロープ蛋白を変化させる事により免疫系を逃れ、慢性感染を起こす事が予想されており、本発明はHCVのHVRを含むE1-E2の一部のSSCPバンドパターンの変化を簡便に経時にとらえこのことを証明する共に、C型肝炎に対する薬物療法の効果判定のモニターとして有用であると考えられた。

#### 【0035】

##### 【表1】

レーン	血清採取時期	GTP, IU/L
1	IFN治療中 8週目	80
2	12週目	77
3	16週目	80
4	24週目	74
5	IFN治療後 8週目	196
6	16週目	101
7	24週目	54
8	分子量マーカー: $\lambda$ /HindIII	

#### 【0036】実施例3

C型肝炎慢性患者血清(MS13とYCA(5'-ACTCGCAAGCACCCCTATCA-3')を用いたPCRによりcDNAが増幅されたもの)50例を用い、実施例1と同様にして、1

30回目のPCRまでを行った。次いで、下記表2に示す組合せのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて2回目のPCRを行った。各組合せのプライマーを用いた場合の検出率を下記表2に示す。表2に示すように、2回目のPCRにはMS2とMR2又はMS3とMR2を用いた時検出率が最も高かった。

#### 【0037】

##### 【表2】

2回目のPCRに使用する オリゴヌクレオチドの組み合わせ。	検出率
MS2, MR2	99%
MS3, MR2	99%
MS5, MR2	75%
MS6, MR2	80%

#### 【0038】実施例4

参考例1に記載した方法により得られたクローニングのうちの3つ(クローニングA、B、C)を用いて次の実験を行った※50

※た。すなわち、クローニングAとクローニングBを1:0、1:1、1:0.8、1:0.6、1:0.4、1:0.2、1:0.1、及び0:1の比率に混合した試料につ

11

いて、実施例1と同様に、PCR、SSCP解析を行った。なお、1回目のPCRにはMR1とMS1をプライマーとして用い、2回目のPCRにはMS2とMR2をプライマーとして用いた。その結果、クローンが単一の場合は2本のバンドが、2種混合の場合には4本のバンドが検出された。しかも、混合の場合、混合比率によりクローンBのバンドの太さが変化したので、ある程度定量的にその比率を予測することができた。

【0039】クローンBとクローンCの混合物及びクローンA、B、Cの混合物についても同様に試験した。その結果、3クローン混合の場合には6本のバンドが検出され、2クローン混合の場合には4本のバンドが検出された。このように、本発明の方法により、検体中のHCVのクローン数を確実に知ることができる。なお、クローンA、B、CのHVR領域の変異部分の配列を図16に示す。

【0040】実施例5 HCVの5'非翻訳領域の増幅 5'非翻訳領域についてもその共通塩基配列を検索しオリゴヌクレオチドMS13を設定した。実施例1同様、C型慢性肝炎患者の血清よりRNAを抽出し、オリゴヌクレオチドYCA: 5'-ACTCGCAAGCACCTATCA-3'でcDNA合成し、1回目のPCR増幅でオリゴヌクレオチドMS13とYCAを用い、2回目にYCS2とYCAを用いてPCRを行った(MS13系)。同様に1回目のオリゴヌクレオチドをMS13をYCS1: 5'-CGACACTCCACCATAGATC-3'にかえた場合(YCS1系)と検出率の比較を行った。下記表3に示すように1回目のPCRにMS13を用いた場合の方が従来用いられていたYCS1を用いるより検出率が高かった。HCVタイプIII、IVで特に検出率がより高くなつた。

【0041】

【表3】

MS13系

	陽性	陰性
陽性	68	0
YCS1系 陰性	3	5

【0042】実施例6

複数の領域を同時にSSCP解析を行うことを試みた。この際、増幅する遺伝子の長さを変える事により各領域ごとにSSCPによる解析を後述のように行つた。HCVのHVRを含む領域とHCVゲノム中、最も保存性の高い5'非翻訳領域を同時に増幅し、同時にSSCP解析を行つた。5'非翻訳領域を同時に増幅する事でHCV-

12

RNAの存在および5'非翻訳領域の変異の確認をHVRの解析と同時に行う事ができる。

【0043】C型慢性肝炎患者より実施例1と同様に血清よりRNA抽出後、オリゴヌクレオチドMR1、YC Aを等量混合しcDNA合成後、オリゴヌクレオチドMS1、MR1、MS13、YCAを等量混合しPCRを行い、その一部をさらにオリゴヌクレオチドMS2、MR2、YCS2、YCAを用いてPCRを行つた。増幅産物を実施例1と同様にSSCP解析を行つた。

10 【0044】その結果、図17に示すように、HCVのHVRと5'非翻訳領域を同時に判別し、1つのレーンで複数の領域を同時にSSCP解析する事ができた。

【0045】

【発明の効果】本発明により、検体中のHCVのクローン数を確実、簡便に調べることができるC型肝炎の診断方法及びそれに用いられるオリゴヌクレオチドが提供された。上記から明らかのように、本発明により、検体中のHCVのクローン数を確実に簡便に知ることができるようになったので、そのC型肝炎のIFNによる治療効果を確実に予想することができる。従つて、本発明はC型肝炎の診断及び治療に大いに貢献する。

【0046】実施例7

5'非翻訳領域をSSCP解析によりゲノタイピングを試みた。C型慢性肝炎患者8例より実施例3と同様に、オリゴヌクレオチドYCAを用いてcDNA合成し、1回目のPCRにオリゴヌクレオチドMS13、YCAを用い、2回目のPCRにはオリゴヌクレオチドYCS2とYCAを用いた。実施例1同様SSCP解析を行つた。

30 【0047】その結果、図18に示すように、検出バンド位置により少なくとも2つのパターンに分類できた。岡本らの方法(H. Okamoto et al., J. Gen. Virol. 73: 673-679)でのタイピングを同一検体で実施し、先の結果と比較したところ、下記表4及び5に示すように、相関性を示した。

【0048】

【表4】

SSCPパターン	ゲノタイプ(岡本ら)
I	II
II	III, IV

【0049】

【表5】

40

レーン	検体No.	SSCPパターン	ゲノタイプ(岡本ら)
1	1	I	II
2	2	I	II
3	3	II	III
4	4	II	III
5	5	II	III
6	6	I	II
7	7	I	II
8	8	II	IV

【0050】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 3360

\*配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

\*

配列

TTGGGGGCCA CACTCACCA TAGATCACTC CCGTGTGAGG AACTACTGTC TTCAACGAGA 60  
 AAGCGCTCTAG CCATGGCGTT AGTATGAGTG TTGTGCGACCC TCCAGGACCC CCCCTCCGG 120  
 GAGAGCCATA GTGGCTGCG GAACCGGTGA GTACACCGGA ATTGCCAGGA CGACCGGGTC 180  
 CTTCTTGGA TCAACCCGCT CAATGCCCTGG AGATTTCGGC GTGCCCGCGC GAGACTGCTA 240  
 GCCGAGTAGT GTTGGGTCGC GAAAGGCCTT GTGGTACTGTC CTGATAGGGT GCTTGGAGT 300  
 GCCCGGGAG GTCTCGTAGA CCGTGCATC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT CAA 353  
 Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln  
 1 5  
 AGA AAA ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTT AAG TTC 401  
 Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe  
 10 15 20  
 CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG 449  
 Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg  
 25 30 35 40  
 GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG 497  
 Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser  
 45 50 55  
 CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CGG CCC GAG 545  
 Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu  
 60 65 70  
 GGT AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAC 593  
 Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn  
 75 80 85  
 GAG GGT ATG GGG TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGT GGC TCT CGG 641  
 Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg  
 90 95 100  
 CCT AGT TGG GGC CCC ACA GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT 689  
 Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly  
 105 110 115 120  
 AAG GTC ATC GAT ACC CTT ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC 737  
 Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr  
 125 130 135  
 ATT CCG CTT GTC GGC GCC CCC CTA GGG GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCA 785

15

Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala			
140	145	150	
CAT GGT GTC CGG GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT			833
His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn			
155	160	165	
CTG CCC GGT TGC TCT TTC TCT ATC TTC CTC TTA GCT TTG CTG TCT TGT			881
Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys			
170	175	180	
TTG ACC ATC CCA GCT TCC GCT TAC GAG GTG CGC AAC GTG TCC GGG ATA			929
Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile			
185	190	195	200
TAC CAT GTC ACG AAC GAC TGC TCC AAC TCA AGT ATT GTG TAT GAG GCA			977
Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala			
205	210	215	
GCG GAC ATG ATC ATG CAC ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTC OGG GAG			1025
Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu			
220	225	230	
AGT AAT TTC TCC CGT TGC TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTC GCG GCC			1073
Ser Asn Phe Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala			
235	240	245	
AGG AAC AGC AGC ATC CCC ACC ACG ACA ATA CGA CGC CAC GTC GAT TTG			1121
Arg Asn Ser Ser Ile Pro Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu			
250	255	260	
CTC GTT GGG GCG GCT CTC TGT TCC GCT ATG TAC GTT GGG GAT CTC			1169
Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu			
265	270	275	280
TGC GGA TCC GTT TTT CTC GTC TCC CAG CTG TTC ACC TTC TCA CCT CGC			1217
Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg			
285	290	295	
CGG TAT GAG ACG GTA CAA GAT TGC AAT TGC TCA ATC TAT CCC GGC CAC			1265
Arg Tyr Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His			
300	305	310	
GTA TCA GGT CAC CGC ATG GCT TGG GAT ATG ATG ATG AAC TGG TCA CCT			1313
Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro			
315	320	325	
ACA ACG GCC CTA GTG GTA TCG CAG CTA CTC CGG ATC CCA CAA GCC GTC			1361
Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val			
330	335	340	
GTG GAC ATG GTG GCG GGG GCC CAC TGG GGT GTC CTA CGC GGC CTT GCC			1409
Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala			
345	350	355	360
TAC TAT TCC ATG GTG GGG AAC TGG GCT AAG GTC TTG ATT GTG ATG CTA			1457
Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu			
365	370	375	
CTC TTT GCT GGC GTT GAC GGG CAC ACC CAC GTG ACA GGG GGA AGG GTA			1505
Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val			
380	385	390	
GCC TCC AGC ACC CAG AGC CTC GTG TCC TGG CTC TCA CAA GGC CCA TCT			1553
Ala Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser			
395	400	405	

17

CAG AAA ATC CAA CTC GTG AAC ACC AAC GGC AGC TGG CAC ATC AAC AGG	1601
Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg	
410 415 420	
ACC GCT CTG AAT TGC AAT GAC TCC CTC CAA ACT GGG TTC ATT GCT GCG	1649
Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala	
425 430 435 440	
CTG TTC TAC GCA CAC AGG TTC AAC GCG TCC GGG TGC CCA GAG CGC ATG	1697
Leu Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met	
445 450 455	
GCT AGC TGC CGC CCC ATC GAT GAG TTC GCT CAG GGG TGG GGT CCC ATC	1745
Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile	
460 465 470	
ACT CAT GAT ATG CCT GAG AGC TCG GAC CAG AGG CCA TAT TGC TGG CAC	1793
Thr His Asp Met Pro Glu Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His	
475 480 485	
TAC GCG CCT CGA CCG TGC GGG ATC GTG CCT GCG TCG CAG GTG TGT GGT	1841
Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly	
490 495 500	
CCA GTG TAT TGC TTC ACT CCG AGC CCT GTT GTA GTG GGG ACG ACC GAT	1889
Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp	
505 510 515 520	
CGT TTC GGC GCT CCT ACG TAT AGC TGG GGG GAG AAT GAG ACA GAC GTG	1937
Arg Phe Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val	
525 530 535	
CTG CTA CTT AGC AAC ACG OGG CCG CCT CAA GGC AAC TGG TTT GGG TGC	1985
Leu Leu Leu Ser Asn Thr Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys	
540 545 550	
AAG TGG ATG AAC AGC ACT GGG TTC ACC AAG ACG TGC GGG GGC CCT CGG	2033
Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro	
555 560 565	
TGC AAC ATC GGG GGG GTC GGC AAC AAC ACC TTG GTC TGC CCC ACG GAT	2081
Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Val Cys Pro Thr Asp	
570 575 580	
TGC TTC CGG AAG CAC CCC GAG GCC ACT TAC ACA AAG TGT GGC TCG GGG	2129
Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly	
585 590 595 600	
CCC TGG TTG ACA CCC AGG TGC ATG GTT GAC TAC CCA TAC AGG CTC TGG	2177
Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp	
605 610 615	
CAC TAC CCC TGC ACT GTT AAC TTT ACC GTC TTT AAG GTC AGG ATG TAT	2225
His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Val Phe Lys Val Arg Met Tyr	
620 625 630	
GTG GGG GGC GTG GAG CAC AGG CTC AAT GCT GCA TGC AAT TGG ACT CGA	2273
Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg	
635 640 645	
GGA GAG CGC TGT GAC TTG GAG GAC AGG GAT AGG TCA GAA CTC AGC CGG	2321
Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro	
650 655 660	
CTG CTG CTG TCT ACA ACA GAG TGG CAG ATA CTG CCC TGT TCC TTC ACC	2369
Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr	

19

665	670	675	680	
ACC CTA CGG GCC CTG TCC ACT GGC TTG ATC CAT CTT CAC CGG AAC ATC				2417
Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Arg Asn Ile				
685	690	695		
GTG GAC GTG CAA TAC CTG TAC GGT ATA GGG TCG GCA GTT GTC TCC TTT				2465
Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Ile Gly Ser Ala Val Val Ser Phe				
Va 700	705	710		
GCA ATC AAA TGG GAG TAT ATC CTG TTG CTT TTC CTT CTG CGG GAC				2513
Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Ile Leu Leu Leu Phe Leu Leu Ala Asp				
715	720	725		
GCG CGC GTC TGT GCC TGC TTG TGG ATG ATG CTG CTG ATA GCC CAG GCT				2561
Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala				
730	735	740		
GAG GCC ACC TTA GAG AAC CTG GTG GTC CTC AAT GCG GCG TCT GTG GCC				2609
Glu Ala Thr Leu Glu Asn Leu Val Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala				
745	750	755	760	
GGA GCG CAT GGC CTT CTC TCC TTC CTC GTG TTC TTC TGC GCC GCC TGG				2657
Gly Ala His Gly Leu Leu Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp				
765	770	775		
TAC ATC AAA GGC AGG CTG GTC CCT GGG GCG GCA TAT GCT CTC TAT GGC				2705
Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Tyr Gly				
780	785	790		
GTA TGG CGG TTG CTC CTC TTG CTG GCC TTA CCA CCA CGA GCT TAT				2753
Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr				
795	800	805		
GCC ATG GAC CGA GAG ATG GCT GCA TCG TGC GGA GGC GCG GTT TTT GTA				2801
Ala Met Asp Arg Glu Met Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Val				
810	815	820		
GGT CTG GTA CTC TTG ACC TTG TCA CCA TAC TAT AAG GTG TTC CTC GCT				2849
Gly Leu Val Leu Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Phe Leu Ala				
825	830	835	840	
AGG CTC ATA TGG TGG TTA CAA TAT TTT ATC ACC AGA GCC GAG GCG CAC				2897
Arg Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His				
845	850	855		
TTG CAA GTG TGG GTC CCC CCT CTC AAT GTT CCG GGA GGC CGC GAT GCC				2945
Leu Gln Val Trp Val Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala				
860	865	870		
ATC ATC CTC CTT ACA TGC GCG GTC CAT CCA GAG CTA ATC TTT GAC ATC				2993
Ile Ile Leu Leu Thr Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile				
875	880	885		
ACC AAA CTC CTG CTC GCC ATA CTC GGT CCG CTC ATG GTG CTC CAG GCT				3041
Thr Lys Leu Leu Ala Ile Leu Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala				
890	895	900		
GGC ATA ACT AGA GTG CCG TAC TTT GTA CGC GCT CAG GGG CTC ATC CGT				3089
Gly Ile Thr Arg Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg				
905	910	915	920	
GCA TGC ATG TTA GTG CGG AAG GTC GCT GGA GGC CAC TAT GTC CAA ATG				3137
Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Val Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met				
925	930	935		
GCC TTC ATG AAG CTG GCC GCG CTG ACA GGT ACG TAC GTA TAT GAC CAT				3185

21

Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His  
 940 945 950  
 CTT ACT CCA CTG CGG GAT TGG GCC CAC GCG GGC CTA CGA GAC CTT GCG 3233  
 Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala  
 955 960 965  
 GTG GCA GTA GAG CCC GTC GTC TTC TCT GAC ATG GAG ACT AAA CTC ATC 3281  
 Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe Ser Asp Met Glu Thr Lys Leu Ile  
 970 975 980  
 ACC TGG GGG GCA GAC ACC GCG GCG TGT GGG GAC ATC ATC TCG GGT CTA 3329  
 Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu  
 985 990 995 1000  
 CCA GTC TCC GCC CGA AGG GGG AAG GAG ATA C 3360  
 Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Lys Glu Ile  
 1005 1010

【0051】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CACCGCATGG CWTGGGATAT

20

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

\*

【0052】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GGGCTNGRG TGAAAGCARTA

20

20\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

※

【0053】配列番号：4

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

TTGGGATATG ATGATGAACCT GG

22

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

★

【0054】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CTGTTGATGT GCCAGCTGCC

20

30★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

★

【0055】配列番号：6

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

GGATATGATG ATGAAGTGG

19

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

◆

【0056】配列番号：7

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

TCYGTCTCAT TYGCCCTCCA

19

40\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

\*

【0057】配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列

GGNCAYHGNA TGGCCTGG

18

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

※

【0058】配列番号：9

★ 50★配列の長さ：18

23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

GCTACTCTTT GCGGGCGT

【0059】配列番号：10

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

CTCTTTGCCG GCGTTGACG

【0060】配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GAGGAAC TAC TGTCTTCAG

【0061】配列番号：12

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

ACTCGCAAGC ACCCTATCA

【0062】配列番号：13

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列

CGACACTCCA CCATAGATC

【0063】配列番号：14

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列

CGCCCGCCGC GCCCCGCCGC CGTCCCGCCG CCCCCGCC

19

【図面の簡単な説明】

【図1】HCVゲノムの一部の塩基配列の一例と、本発明のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする領域を示す図である。

【図2】図1の続きを示す図である。

【図3】本発明のオリゴヌクレオチドMS1、MS2、MS3及びMS4を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図4】図3の続きを示す図である。

【図5】図4の続きを示す図である。

【図6】図5の続きを示す図である。

【図7】本発明のオリゴヌクレオチドMR2を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図8】図7の続きを示す図である。

【図9】図8の続きを示す図である。

【図10】図9の続きを示す図である。

【図11】図10の続きを示す図である。

【図12】本発明のオリゴヌクレオチドMR1を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

40

30※異同を比較する図である。

【図13】本発明のオリゴヌクレオチドMS5及びMS6を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図14】本発明のオリゴヌクレオチドMR1'を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図15】IFN $\alpha$ 不応例の慢性C型肝炎患者について、IFN治療中及び治療後のHCV-HVRのSSCP解析を本発明の方法により行った結果の電気泳動パターンを示す模式図である。

【図16】3種のクローンを利用して、本発明の方法によりクローン数の測定を行った実験に用いた各クローンの変異領域の塩基配列を示す図である。

【図17】HVR領域と5'非翻訳領域の両方を長さを変えて同時に増幅させた産物についてのSSCP電気泳動のパターンを示す模式図である。

【図18】HCVの5'非翻訳領域のSSCP解析を本発明の方法により行った結果の電気泳動パターンを示す模式図である。

24

\*配列の種類：他の核酸

\*

18

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

※

19

10★トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

★

20

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

☆

19

20◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

◆

19

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

\*

40

30※異同を比較する図である。

【図13】本発明のオリゴヌクレオチドMS5及びMS6を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図14】本発明のオリゴヌクレオチドMR1'を設定した根拠となる、種々のクローンの当該領域の塩基配列を異同を比較する図である。

【図15】IFN $\alpha$ 不応例の慢性C型肝炎患者について、IFN治療中及び治療後のHCV-HVRのSSCP解析を本発明の方法により行った結果の電気泳動パターンを示す模式図である。

【図16】3種のクローンを利用して、本発明の方法によりクローン数の測定を行った実験に用いた各クローンの変異領域の塩基配列を示す図である。

【図17】HVR領域と5'非翻訳領域の両方を長さを変えて同時に増幅させた産物についてのSSCP電気泳動のパターンを示す模式図である。

【図18】HCVの5'非翻訳領域のSSCP解析を本発明の方法により行った結果の電気泳動パターンを示す模式図である。

## 【図1】

## 5' 非翻訳領域

1 TTGGGGCGA CACTCCACCA TAGATCACTC CCCTGTGAGG AACTACTGTC TTCACCCAGA  
 MS 1 3  
 61 AAGCGCTCTAG CCATGGCGTT AGTATGAGTG TTGTGCAGCC TCCAGGACCC CCCCTCCCGG  
 121 GAGAGCATA GTGGTCTCGG GAAACGGTGA GTACACCGGA ATTGGCCAGGA CGACCCGGTC  
 181 CTTTCTTGGG TCAACCCCGT CAATGCGCTGG AGATTTGGC GTGCCCCCGC GAGACTGCTA  
 241 GCGCAGTAGT GTTGGGTGCG GAAAGGCCTT GTGGTACTGC CTGATAGGGT GCTTGCGAGT  
 301 GCGCCGGGAG GTCTCGTAGA CCCTGCCATC

## 翻訳領域

A TGACCAACAA TCCCTAACCT CAAAGAAAAA  
 361 CCAAACGTA CACCAACCCG CCCCCACAGG ACCTTAAGTT CCCGGGGGGT GGTCAAGATCG  
 421 TTGGTGGAGT TTACCTGTTG CCGCCGAGGG GCGGCAAGTT GGGTGTGCGC GCGACTAGGA  
 481 AGACTTCCGA GCGGTCGCAA CCTCGTGGAA GCGCACAAAC TATCCCAAG GCTCGCCGC  
 541 CCCAGGGTAG GACCTGGGCT CAGCCCCGGT ACCCTTGCCC CCTCTATGGC AACGAGGTA  
 601 TGGGTGGGC AGGATGGCTC CTGTCACCCC GTGGCTCTGG GCCTAGTTGG GGCOCACAG  
 661 ACCCCCCGGC TAGGTGCGCT ATTGGGTA AGGTCACTGAA TACCCCTTACA TCGGGCTTCG  
 721 CCCACCTCAT GGGGTACATT CGCGCTTGTGCG GGGCCCCCGT AGGGGGGGCT GCGAGGGGCC  
 781 TGGCACATGG TGTCGGGGT CTGGAGGACG GGGTGAACTA TGCAACAGGG AATCTGCCG  
 841 GTGCTCTTT CTCTATCTC CTCTAGCTT TGCTGTCTGG TTGACCCATC CCAGCTTCCG  
 901 CTTACGAGGT GCGCAACGTT TCCGGGATAT ACCATGTCAAC GAAAGACTGC TCCAACCTAA  
 961 GTATTGTGTA TGAGGCAGCG GACATGATCA TGACACACCC CGGGTGGCTG CCCTGGCTCC  
 1021 GGGAGAGTAA TTCTCCCGT TGCTGGTAG CGCTCACTCC CACCGCTCGG GCGAGGAACA  
 1081 GCACCATCCC CACCAAGACA ATACGACGCC ACCTGCAATT GCTCGTTGGG GCGGCTGCTC  
 1141 TCTGTTCCCG TATGTAACGTT GGGGATCTCT GCGGATCCTG TTTCCTCGTC TCCCAGCTGT  
 1201 TCACCTTCTC ACCTCGCGG TATGAGACGG TACAAGGATG TAAATTGCTCA ATCTATCCCG  
 1261 GCCACGTATC AGGTCAACCCG ATGGCTTGGG ATATGATGAT GAACTGGTCA CCTACAAACGG  
 M 1, M 2, M 3, M 4 を含む領域

1321 CCCTAGTGGT ATCCGAGCTA CTCCGGATCC CACAAGCCGT CGTGGACATG GTGGGGGGGG  
 1381 CCCACTGGGG TGTCTAGCG GGCCTTGCGT ACTATTCCAT GGTGGGGAAC TGGGCTAAGG  
 1441 TCTTGATTGT GATCTACTC TTGCTGGCG TTGACGG  
 M 5, 6 を含む領域

## H C V - H V R

1478 5' GCA CACCCACGTG ACAGGGGGAA  
 1501 GGGTAGCCTC CAGCACCCAG AGCCTCGTGT CCTGGCTCTC ACAAGGCGCA TCTCAAGAAA  
 1561 T S'

CCAACTCGT GAACACCAAC GGCAGCTGGC ACATCAACAG GACCGCTCTG AATTGCAATC  
 M R 2 の相補鎖を含む領域

1621 ACTCCCTCCA AACTGGGTT ATTGCTGCGC TTGCTACCG ACACAGGTT AACGGCTCCG  
 1681 GGTCCCCAGA GCGCATGGCT AGCTGCGGCC CCATCGATGA GTTCGCTCAC CGGTGGGCTC  
 1741 CCATCACTCA TGATATGCCG GAGAGCTCGG ACCAGAGGCC ATATTGCTGG CACTACCCG  
 M R 1 の相補鎖

1801 CTCGACCGTG CGGGATCGTG CCTGCGTGC AGGTGTGTTG TCCAGTGTAT TGCTTCACTC  
 を含む領域

1861 CGAGCCCTGT TGTAGTGGGG ACCACCGATC GTTTCGGCGC TCCCTACGTAT AGCTGGGGGG  
 M R 1

1921 AGAATGAGAC AGACGTGCTG CTACTTAGCA ACACGGGGCC GCCTCAAGGC AACTGGTTTC  
 の相補鎖を含む領域

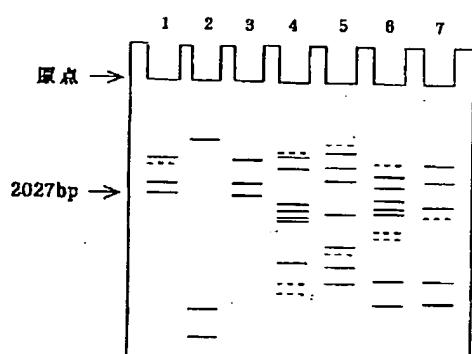
## 【図16】

クローンA: GGGGAGACCCACGTGACAGGGGGGAGCCAGGGTGGCGCCGCTCCGGCTCACAGGTCCCTCACAGTT  
 クローンB: C---AGA---GT-----G-----T-----  
 クローンC: -----GT-----T-----

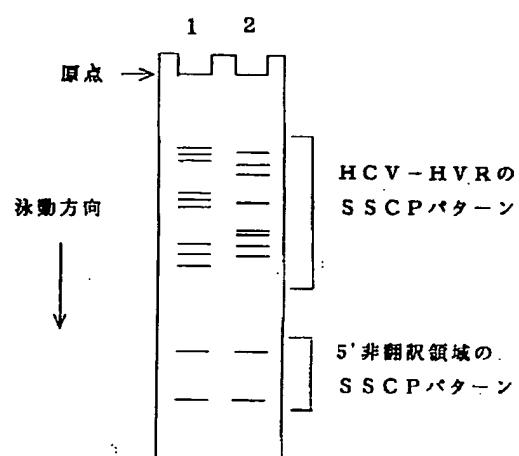
【図2】

1981 GGTGCACGTG GATGAACAGC ACTGGGTCA CCAAGACGTG CGGGGGCCCT CCGTCAACA  
 2041 TCGGGGGGGT CGGCAACAAAC ACCTTGGTCT GCCCCACGGA TTGCTTCGGG AAGCACCCCG  
 2101 AGGCCACTTA CACAAAGTGT GGCTCGGGC CCTGGTTGAC ACCCAGGTGC ATGGTTGACT  
 2161 ACCCATACAG GCTCTGGCAC TACCCCTGCA CTGTTAACTT TACCGTCTTT AAGGTCAAGGA  
 2221 TGTATGTGGG GGGCGTGGAG CACAGGCTCA ATGCTGCATG CAATTGGACT CGAGGAGAGC  
 2281 GCTGTGACTT GGAGGACACGG GATAGGTCAAG AACTCAGCCC GCTGCTGCTG TCTACAACAG  
 2341 AGTGGCAGAT ACTGCCCCGT TCCTTCACCA CCCTTACCGGC CCTGTCCACT GGCTTGATCC  
 2401 ATCTTCACCG GAACATCGTG GACGTGCAAT ACCTGTACCGG TATAGGGTCG GCAGTTGCT  
 2461 CCTTTGCAAT CAAATGGGAG TATATCTGT TGCTTTCTT TCTTCTGGCG GACGGCCGCG  
 2521 TCTGTGCCCTG CTTGTGGATG ATGCTGCTGA TAGCCCCAGGC TGAGGCCACC TTAGAGAAC  
 2581 TGGTGGTCTT CAATGCGGGC TCTGTGGCCG GAGCGCATGG CCTTCTCTCC TTCTCGTGT  
 2641 TCTTCTGGC CGGCTGGTAC ATCAAAGGCA GGCTGGTCCC TGGGGCGGGCA TATGCTCT  
 2701 ATGGCGTATG GCGGTGCTC CTGCTCTTGC TGCCCTTACC ACCACGAGCT TATGCCATGG  
 2761 ACCGAGAGAT GGCTGCAATG TGCGGAGGCG CGGTTTTTGT AGGTCTGCTA CTCTTGACCT  
 2821 TGTCAACCATA CTATAAGGTG TTCTTCGCTA GGCTCATATG GTGGTTACAA TATTTTATCA  
 2881 CCAGAGCCGA GGCGCACTTG CAAGTGTGGG TCCCCCTCT CAATTTCTGG GGAGGCCCCG  
 2941 ATGCCATCAT CCTCCCTTACA TGCGCGGTCC ATCCAGAGCT AATCTTGAC ATCACCAAAC  
 3001 TCCTGCTCGC CATACTGGT CGCGCTCATGG TGCTCCAGGC TGGCATAACT AGAGTGGCGT  
 3061 ACTTTGTACG CGCTCAGGGG CTCATCCGTG CATGCATGTT AGTGCAGGAAG GTGGCTGGAG  
 3121 GCCACTATGT CCAAATGGCC TTCATGAAGC TGGCCGGCCT GACAGGTACG TACCTATATG  
 3181 ACCATCTTAC TCCACTGCGG GATTGGGCC ACGGCGGCCCT ACAGAGACCTT GCGGTGGCAG  
 3241 TAGAGCCCGT CGTCTCTCT GACATGGAGA CTAAACTCAT CACCTGGGGG GCAGACACCG  
 3301 CGGCCTGTGG GGACATCATC TCGGGTCTAC CAGTCTCCGC CCGAAGGGGG AAGGAGATAC

【図15】

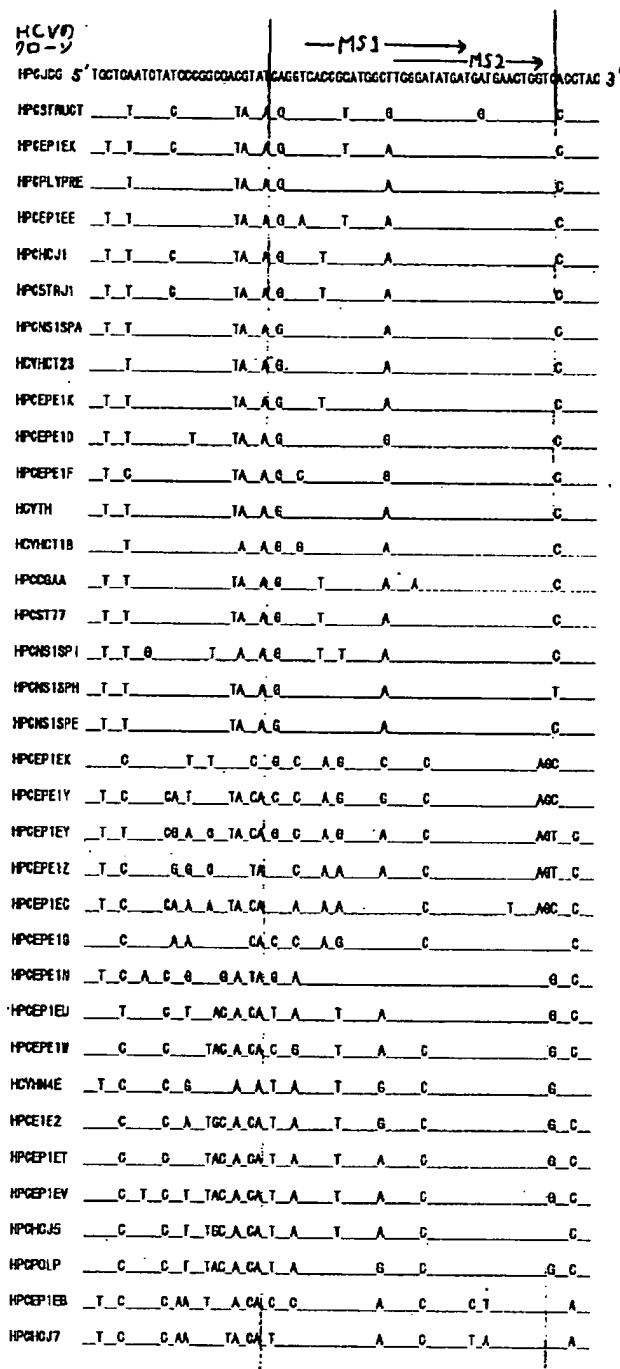


【図17】

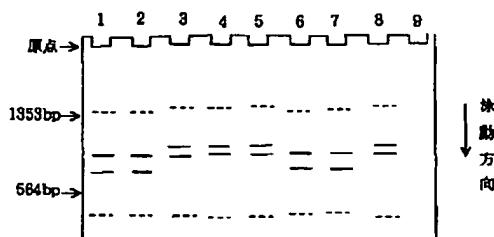


1: IFN無効例、C型慢性肝炎患者  
 2: IFN無効例、C型慢性肝炎患者

【図3】



【図18】



【図4】

HPCPEP16	C		C
HPCPEP58	C	T	
HPCPEP2	C	C	T
HPCPEP1	C	T	T
HCVGEN			B
HPCCEPA	T	T	TA
		A	G
		T	A
HPCCEP3	C		A
HPCCEP1			B
HPCPEP53			
HPCJCG			
HPCNS1SPJ	CC		C
HCVJK5	C		B
HCVJK2	C	T	C
HPCUHCCDS		G	C
HCVRIE1	T		T
HPCPEP1X	T		T
HPCPEP1S	T	C	C
HPCPEP1I	C		C
HPCPEP1J	C		
HPCPOLYPR	T	B	C
		C	CG
		CG	C
		C	C
HPCPEP1B			
HPCPEP1B		T	
HCVHUE1	T		A
HPCNS1SP1		T	T
UD1214		T	C
		A	C
		C	T
S46012		T	GA
HPCPEP64		C	A
HCVHN3E	T	T	M
		A	A
		G	G
HPCNS1SPF		T	B
		B	C
		C	T
HPCNS1SPD		C	T
		B	C
HPCRNASP		C	T
		B	C
HPCGENANT		A	C
		C	B
HPCCGENDW		A	
HPCRCIA	B	T	A
		A	C
HPCPETEH		A	

【図5】

HPCJ2G	T	C	C	A	T	A	C	C	A	G	T	A
HPCPE10	T	C	C	A	A	T	T	A	C	C	A	A
HPCPE1S	T	C	C	A	A	T	G	T	A	C	A	A
HPCPE1V	T	C	C	A	A	T	A	C	C	C	A	A
HPCPE1L	G	C	G	C	A	T	G	T	A	T	C	C
HPCPE1C	G	C	G	C	A	T	G	T	A	T	C	C
HPCSTRUCT	T	G	G	C	A	T	T	T	A	T	C	C
HPCPE1F	G	G	C	A	T	A	T	A	T	T	C	C
HPCPE1H	G	G	C	A	T	T	T	A	T	A	T	C
HPCPE1N	G	G	C	A	T	T	T	A	T	A	T	C
HPCPE1TEN	G	G	G	C	A	T	T	T	A	T	A	T
HCVENS1	C	A	C	A	T	C	T	A	T	A	T	C
HPCDEM1R	G	A	C	A	T	T	A	T	T	G	C	C
HPCPE1D	T	C	T	C	A	T	T	A	C	C	T	
HPCPE1E	G	A										
HCVJK3	T		A	A	T		C			G	C	
HPCNS1SPK	T	A	O	C	T	T				G		
571864	T		T	A	C	C	T	T	A		G	
HPCPE1U			A	T						G	C	
HPCJNR	T		T	G	G	T		C		G	C	
HPCPE1T			T	C	G			C		G		
HPCJ491			T									
HPOSTRJ4			TT									
HPCJ483			TT									
HPCSTRUCT	G		T				G		G			
HPCHCJ2	T				TC							
HPCJTB			T							G		
HPCJTA			T							G		
HPCSCREEN										G	A	
HPCPE1J	T		T							G	C	
HPCPE1I			T							G	O	
HCVHJ1E	G	T		A	C	T						
HCVJK1	C				T							
HCVJK10	C				T							
HCVJK4	C				T	T						
HPCNS1SPK	C		G	C	T	T				G		

【図6】

HCYEG2E1	G	C	T	6	
HCYEP1		C		6	
HCYEG1E1		T	C	6	
HPCEPE1A				6	T
HCYHN2E			T	7	T
HPCEPIEN		A	6	T	C
HPCHS1SPG			6		
HPCEPIEL	T		A		6
HPCEP1EA			6		
HPCHS34D		TA	A		6
HPCE2C8R		TA	A		
HPCHS79D	TA	T	TA	A	G
HPCEP1EW	T	T	TA	A	G
HCYEG1D	T		TA	A	A
HPCEPE1E	T	T	C	TA	T
HCYHCT27	T	C	TA	A	G
HPCEP1ER	T	T	A	A	G
HPCHS1SP8	T	C	TA	A	G

比較的共通な領域

## H C V の E 1 領域中の比較的共通な塩基配列の変異

5' CBGGBCAFHGBATGGCBTGDAFDTGATGBTGAEFTGGD 3'

B=A, T, G, C	E=A, T	D=A, G
F=T, C	H=C, A	

## 共通配列

オリゴヌクレオチド M S 1, M S 2 の位置

M S 1

5' C-GG-CA--G-ATGGC-TGG-A--TGAT--TGA--TGG 3'

M S 2

5' CACCGCATGGCCTGGGATAT 3'

M S 3

5' TGGGATATGATGATGAACCTGG 3'

M S 4

5' GGATATGATGATGAACCTGG 3'

H C V の E 1 領域（一部）の塩基配列アライメントと  
オリゴヌクレオチド M S 1, M S 2 の設定位置。

【図7】

HCVO  
7D-シ

MR2の位置

5' CAABCGCATCTGABAATCGAACTGTTGAGACCAAGGCGACGTCGACATCGAGGACCGCTGATTCGA 3'

HPGJC8 \_GT\_GT\_G\_C\_B\_T\_A\_T\_C\_C

HPGHS1SP0 \_TT\_GT\_GCAA\_G\_TAA\_T\_C\_C

HEPCRE550 \_TT\_B\_GCAA\_G\_G\_TAA\_T\_C\_C

HEPCRE555F \_T\_GT\_GAAC\_G\_TAA\_T\_B\_T\_C\_C

HPG10E1E2 \_TT\_G\_GCG\_G\_T\_G\_TAA\_T\_C\_C

HEPCRE7 \_TT\_G\_G\_ACG\_G\_T\_T\_T\_T\_C\_C

HEPCRE658 \_TT\_G\_G\_C\_G\_TAA\_T\_C\_C

HEPCRE69 \_CT\_G\_C\_C\_G\_TAA\_T\_T\_T\_C\_C

HEPCRE55C \_CT\_GG\_GCG\_C\_TAA\_T\_T\_C\_C

HEPCRE66A \_CT\_GG\_GCG\_C\_TAA\_T\_G\_A\_T\_C\_C

HEPCRE73B \_CT\_A\_BA\_G\_TAA\_T\_T\_T\_C

HPGUNIKDS \_CT\_G\_GG1\_C\_GG\_G\_AAA\_T\_C\_G\_GG

HCYCENSI TCA\_CCAA\_C\_G\_G\_G\_C\_A\_T\_TC\_G\_T\_T\_C\_T

HPGFRL \_C\_G\_GAGG\_C\_A\_G\_GA\_C\_T\_TC\_G\_GT\_C

HPGFRK \_C\_G\_GAGG\_C\_GA\_C\_T\_TC\_G\_GT\_C

HPG5T77 \_C\_G\_GAGG\_C\_GA\_C\_T\_TC\_G\_GT\_C

HPGCGAA \_C\_G\_GAGG\_C\_GA\_C\_T\_TC\_G\_GT\_C

HPG5TRJ1 \_C\_G\_TAGG\_C\_G\_GA\_G\_T\_TC\_G\_GT\_G

HPGHCJ1 \_C\_G\_TAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_TC\_G\_GT\_C

HPGRLYPRE \_C\_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_TC\_G\_G\_C\_C

HPGXI \_C\_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_TC\_G\_G\_C\_C

HPGNS1SPA \_T\_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_T\_T\_C\_G\_GT\_C

HEPCRE42 \_C\_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_TC\_G\_G\_GT\_G

HPG5T90 \_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_A\_T\_TC\_G\_G\_C\_C

HPGFRD \_AG\_GAGG\_C\_C\_G\_GA\_C\_G\_T\_G\_GT\_C

HPGHEIIV \_A\_G\_GAGG\_A\_C\_T\_G\_GA\_C\_T\_T\_T\_G\_GT\_C

HPGNS1SP1 \_G\_GAGG\_C\_T\_GA\_C\_T\_TC\_G\_G\_GT\_C

HEPCRE37B \_C\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_G\_T\_C\_G\_GT\_C

HEPCRE37A \_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_T\_G\_G\_GT\_C

HPGFRG \_TC\_GAGG\_C\_A\_G\_GA\_G\_T\_T\_T\_G\_C\_C

HPGFRH \_G\_GAGG\_T\_G\_GA\_C\_T\_T\_T\_C\_A\_G\_GT\_C

HEPCRE43 \_CG\_G\_GAGG\_C\_G\_GA\_C\_T\_G\_G\_GT\_C

HPGNS1SPE TCG\_G\_GAGG\_C\_GA\_C\_T\_A\_G\_GT\_C

HPGFRD \_GT\_G\_GAGG\_C\_G\_A\_G\_T\_T\_T\_G\_G\_GT\_C

【図8】

HPOM15PK	CT_6G	C_G_T_A	T	T_C_C
HPOPRC4A	CT_6G_G	C_G_T_A	T_T_T	T_C_C
HPOPRC3A	CT_6G_G	G_G_T_A	T_T_T	T_C_C
HPDGEH09	GT_6G_G	G_G_T_A	T_T_T	T_C_C
U01214	CC_6G_G	G_G_T_A	T_T_T	C
HPGJ491	TCT_6G_G	G_T_T		T_C_A
HPGJ483	CT_6G_G	G_G_T		T_C_A_C
HPGSTR4	CT_6G_G	G_G_T		T_C_A_C
HEPCRE56	C_G_G	C_A_A	G_T	T_T
HEPCRE59	C_G_G	G_G_T	G_T	T_T
HOVGE1E2	GTT_G_GA	G_T_A_A	T	A_T_C_A_C
HPGPEP68	TCT_G_GG	G_T_A	T	T_G_C
HPGMPOLYPR	CT_G_G	G_G_T_A	T_T	T_C_C
S02220	CT_G_G	G_G_T_A	T_T	T_C_C
HEPCRE40	GT_G_BA	G_A_G_T_A	T_T	T_A_T_C_C
HPGHMER	AGT_G_G	G_T_A	T_G_T	T_C_C
HEPCRE6	ACG_G_G	C_A_A_A	T	A_T_C
HEPCRE76	TCT_G_G_C	G_G_T_A	T_T	T_C_C
HOVH01E2	TCT_G_GAA	G_G_A_T_A	T	T_C_C
HEPCRE35	CT_G_GG	G_T_A	T	T_C_C
HEPCRE38	TT_G_G	G_T_A_T	T	T_C_C
HPOMS1SPL	CT_G_G_G	G_T_A_T	C_C_T_C	C
HEPCRE71	TCT_FT_G	A_G_G_A	T_T_T	T_C_C
HPGPEP2	TT_G_G_C	G_G_T_A	T	T_C_C
HPGPEP1	TT_G_G_C	G_G_T_A	T	T_C_C
HEPCRE1A	GTT_G_G	G_G_T_A	T_T	T_T_C_A_C
HPGPEP04	CT_G_BAGC	G_T_A	T_T	T_C_C
HEPCRE72A	C_G_G_C	G_G_T_A	T	T_C_C
HEPCRE72B	TC_G_C	G_A_A	T_T	T_C_C
HEPCRE1B	CT_G_G	G_G_T_A	T_T	G_T_C_C
HDVJK4	CT_T_6G	T_T	T	T_C_C
HDVJK1	CT_1_GG	T_T	T	T_C_C
HDVJK1G	CT_1_GG	T_T	T	T_C_C
HPGJTA	G_G_G_G	G_G_A_A	T	T_C_C
HPGJTB	C_G_G_G	G_A_A	T	T_C_G
HEPCRE67	TG_G_GA	AGC_A	T	T_C

【図9】

HPCNS1SPH QT8	C	A	A	G	G	A	C	T	T	T	C	A	C	T	C
HPCFRJ	C	G	C	A	G	C	C	G	T	T	T	C	G	C	T
S66849	T	G	C	A	A	G	G	G	T	C	G	T	C	G	T
HPCFR11	A	G	G	C	A	G	T	G	G	T	C	G	C	T	C
S56310	G	G	T	C	A	G	B	T	G	C	A	G	T	C	T
HPCFRE	C	G	G	C	G	T	G	G	C	T	T	T	C	G	C
HPCFRD	G	G	G	C	A	B	T	G	G	C	T	T	C	G	C
HPC2SE1E2	G	G	A	G	B	C	G	G	A	C	T	T	C	T	C
HPCFRM	C	G	G	C	A	G	T	T	G	T	T	C	C	G	T
HPCFRF	G	G	G	C	A	B	T	G	G	C	T	T	C	G	T
HPCNS1SPB	C	G	G	A	T	G	B	G	A	C	T	T	C	G	C
HPCFRM	C	G	G	A	C	G	G	G	A	C	T	T	C	G	C
HPCFR4	C	G	G	A	C	G	G	G	A	C	T	T	C	G	C
HPCHE1HIV	C	G	C	G	G	A	C	G	B	G	A	C	G	T	C
HPCHCJ7	C	T	C	G	G	B	T	A	G	T	A	C	C	C	C
HPCJ8G	A	C	T	G	C	A	G	G	T	A	C	T	C	C	C
HPOPOLP	T	T	T	C	A	G	G	G	A	C	T	T	C	C	C
HPCHCJ5	T	C	T	G	A	G	G	A	T	T	C	C	T	C	C
HPC1E1E2	C	T	C	A	B	A	T	T	A	T	C	T	C	C	C
HEPCRE73A	G	C	T	A	B	C	T	A	A	T	C	T	C	C	C
HEPCRE4B	G	C	A	T	A	B	T	A	A	T	C	T	C	C	C
HPCENVRSK	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	T	C	C	C
HPCENVR&A	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&I	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&F	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&E	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&G	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&C	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&D	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&H	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&B	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&L	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&N	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&M	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&O	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C
HPCENVR&P	G	C	T	G	G	C	C	T	A	A	T	C	C	C	C

【図10】

HPCEIVRSJ	CC	T	A	T	C								
HPCEIVNTM	CT	GG	GACC	T	A	T	C						
HPCEIVNTD	GT	GG	GAGG	T	A	T	T						
HPCEIVNTC	TT	GG	GAGC	A	T	T	T						
HPCEIVNTB	TT	GG	GAGC	G	T	A	T						
HPCEIVNTA	TT	GG	GAGC	T	A	T	T						
HPCEIVNTD	TT	GG	GAGC	T	A	T	T						
HPCEIVNTH	CT	AG	GAGC	T	A	T	T						
HPCEIVNTJ	CT	AG	GAGC	T	G	T	A	T	T				
HPCEIVNTI	CT	AG	GAGC	T	T	A	T	T					
HPCEIVNTG	TT	AG	GAGC	T	T	A	T	T					
HPCEIVNTF	TT	AG	GAGC	T	T	A	T	T					
HPCEIVNTL	CT	GG	GUAC	T	A	T	T						
HPCEIVNTM	CT	GG	GAAC	T	A	T	T						
HPCPYGP	TC	GG	GAC	G	G	A	A	A	T	C			
HEPCRE54	CT	G	GGAG	G	T	A	T	T	T	A	C		
HECCOREN	T	G	A	GAAG	TA	AC	T	A	T	CT			
HEPCRE68	CT	GG	GAAG	G	T	T	T	T	C	C			
HEPCRE75	TT	GG	G	A	A	T	T	T	T	C			
HEPCRE62	TC	GG	G	G	T	T	T	T	T	T			
HCVJX3	C	G	G	G	T	A	T	T	A	T	C	G	
HCVJX5	C	G	G	G	T	A	T	T	A	T	C	G	
HCVJX2	C	G	B	B	T	A	T	T	TC	A	T	C	G
HEPCRE44	C	GG	G	A	CC	TA	A	T	T	C			
HEPCRE3	TC	GG	G	CC	A	T	A	TT	T	G	T	G	
HEPCRE34	TCT	GG	GG	GC	G	T	A		C	C			
HPGNS1SPG	CT	GG	G	G	A	A			C	C			
HPOBEMANT	GG	G	C	G	T	A	T	T	T	CT	A	C	
HPGNS1SPD	CT	GG	G	C	T	G	T	T	T	C	C		
HEPCRE38	GCT	GG	T		T	A	T	T	A	T	C	C	
HEPCRE74	CT	AG	C	B	TA	A	G	T	T	C	C		
S71854	T	T	GG	G	G	A	R	T	T	T	C	A	C
HPGPRC11A	ACC	GG	GG	GC	T	B	TA	A	T	T	C	C	
HPGHC42	CT	GG	G	A	G	B	TA	A	T	T	C	C	

〔四〕 111

## HCVのE2/NS1領域中の比較的共通な塩基配列の変異

5' GGJEJKJGCDFDTLADEMGBACBGC 3'

**B=A, T, G, C**      **E=A, T**      **D=A, G**      **K=C, G, T**  
**F=T, C**      **H=C, A**      **J=G, C**      **L=C, A, T**      **M=A, C**

共通配列 5' GG-----GC---T-A---G-AC-GC 3'  
 MR 2 5' GGCAGCTGGCACTAACACAG 3' の相補鎖をMR 2とした。  
 5' CTGTTGATGTGCCAGCTGCC 3'

## オリゴヌクレオチドMR2の位置

図2. HCVのE2/NS1領域（一部）の塩基配列アライメントとオリゴヌクレオチドMR2の設定位置。

【図12】

HCV7ローン <sup>※25)</sup>  
 HPCJTA 5' TACTGTTTCAACCCCAAGCCCCGTGTTGT 3'  
 HPCPLYPRE T C T C C G  
 HPCPOLYP T C T C C G  
 HPCHCJ1 T C T C C G  
 HPCST90 C T C C G  
 HPCST77 T C T C C G  
 HPCCGAA T C T C C G  
 HPCMS2PA T C T C C G  
 HPCUNKCDS C G T C  
 HCVJK3 T C G  
 HCVJK5 T  
 HCVJK2 T  
 HCVJK4 T C  
 HCVEG1E2 C G  
 HCVBU1E2 T C  
 HPCPVGP T C G T  
 HPCJCG T C T G  
 HPCCGENOM T C  
 HPCBUNMR C C  
 HPCPOLYPRE T C T  
 U01214 T C T A  
 HPCJTB  
 HPCJTA  
 HPCJ483 T C  
 HPCJ491 T  
 HCVCR1E2 T C C  
 HPCGENANT T C C  
 HCVJK1G T  
 HCVJK1 T  
 S62220 T C CT  
 HPCCOREBN T C  
 HPCPOLP G A A  
 HPCHCJ7 T C C  
 HPCJ8G T  
 HPCB1E2 T C A A  
 HPCHCJ5 T C A G

## H C V の E 2 / N S 1 領域中の比較的共通な塩基配列の変異

5' TEFTGFTFFACFCCBAGFCCCLGTBGF 3'

B=A, T, G, C      E=A, T  
 F=T, C      L=A, T, C

共通配列      5' T--TG-T--AC-CC-AG-CC-GT-G- 3'  
 M R 1      5' TAFIGCTTCACFCCBAGCCCC 3' の相補鎖を M R 1 とした。  
 5' GGGCTBGGDGTGAAGCADTA 3'

H C V の E 2 / N S 1 領域（一部）の塩基配列アライメントと  
 オリゴヌクレオチド M R 1 の設定位置

【图13】

【図14】

HPCJ7A	ATAACTGGGGGGCGAATAGAGACAGAATGCTGCTTCTCAACAAACACGGGGCCACAA-
HPCPLYPRE	C_G T_AA T_G C CT CG_C T T CA A G TG
HPCPOLYP	C_G T_AA T_G C CT CG_C T T CA A G TG
HPCBCJ1	C T_A C_G C CT CG_C CA A G TG
HPCST90	C T_AA T_G C CA_C T CA A G TG
HPCST77	C_G T_A T_G CT CG_C T CA A G TG
HPCCGAA	C_G T_A T_G CT CG_C T CA A G TG
HPCMS2PA	C_G T_A T_G CT CG_C T CA A G TG
HPCURKDS	C_G A G_C C_T G_C G G
HCVJK3	C_C AA G_C A_C T A G_C
HCVJK5	----- G_C AG_C T G
HCVJK2	----- G_C AG_C T G
HCVJK4	----- G_C AG_C T G
HCV61B2	CG AA G_C C C_T TT G G
HCVBU1B2	C_GT A CA G_C C G G
HPCPVGP	G A C CG_A G
HPCJCG	G A C A T_G T
HPCCGENOM	G A C C G G
HPCBMR	GA A C T_C G G
HPCPOLYP	C_G A C T_T_C C_T G
U01214	G A G_C C G G
HPCJTB	----- A
HPCJ7A	-----
HPCJ483	G A C_A T
HPCJ491	G A C_A C T
HCVCRI82	G G_C G G
HPCCBANT	G A G_C A_C T A G
HCVJK1G	AC G_C A_C G
HCVJK1	AC G_C A_C G
S62220	AT G_C C_A G
HPCCORBBN	G G_C A_C T G G
HPCPOLP	C_CG A CT_C AT_G G T A A G G
HPCBCJ7	G T A C C CT_T G_A T_G A A A C_G G
HPCJ8G	C_C A_AA_C C CT_C G_A T_G A A A C_G G
HPCB182	C_CG A_A C CT_C AT_G G T A G_GG
HPCHCJ5	C_CG AA CT_C AT_G G T A A G_GG

A  
G  
A